

DIE WIRKUNG VON CYCLOPHOSPHAMID
AUF DAS FIBROSARKOM SSK 31 DER MAUS

Rudolf Wiedmann

1982



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554012_0007

Aus dem Strahlenbiologischen Institut
der Universität München
Vorstand: Prof.Dr.med.K.-R.Trott

DIE WIRKUNG VON CYCLOPHOSPHAMID AUF DAS FIBROSARKOM SSK 31
DER MAUS

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Rudolf W I E D M A N N
aus Dachau

München 1982

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. K. R. Trott
Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Riethmüller
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 1.7.1982



DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Für die Überlassung des Themas möchte ich Herrn Prof. Dr. K.R. Trott herzlich danken.

Herrn Dr. Kummermehr habe ich für die intensive Betreuung bei der Gestaltung dieser Arbeit ganz besonders Dank zu sagen.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Institutes für Strahlenbiologie und der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg, die mir technischen Beistand bei der Entstehung der Arbeit leisteten.

Der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, München-Neuherberg, danke ich für die Bereitstellung der Versuchstiere, sowie für die Möglichkeit, die Arbeit in ihren Versuchsräumen durchzuführen.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite:

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	2
2.1. Tierstamm	2
2.2. Tumorsystem	2
2.3. Zytostatikum	3
2.4. Transplantation des Tumors	5
2.5. Messung der TumorgroÙe	5
2.6. Kriterien für die Auswahl des Versuchsmaterials	8
2.7. Versuchsaufbau	9
2.7.1. Toxizitätsbestimmung von CY	9
2.7.2. Behandlung tumortragender Tiere mit CY-Einzeldosen	9
2.7.3. Fraktionierte Behandlung mit CY	9
2.8. Graphische und rechnerische Auswertung der Behandlungseffekte	10
2.8.1. Ermittlung der Wachstumsverzögerung	10
2.8.2. Quantifizierung des Dosiseffektes	10
2.8.3. Volumenwachstumskurven bei CY-Einzeldosen	11
3. Ergebnisse	12
3.1. Toxizität nach Einzeldosen von CY	12
3.2. Kalibrierungskurve der TumorgroÙenmessung	12
3.3. Wirkung von CY-Einzeldosen auf den Tumor	15
3.3.1. Wachstumsverhalten behandelter Tumoren	15
3.3.2. Dosiswirkungsbeziehung der Wachstumsverzögerung	16
3.4. Wirkung fraktionierter Dosen auf das Tumorwachstum	17
3.4.1. Fraktionierungsintervalle 0 bis 24 Stunden	17
3.4.2. Fraktionierungsintervalle 0 bis 7 Tage	20
3.5. Wachstumsgeschwindigkeit behandelter Tumoren	22
3.6. Einfluß der AusgangsgroÙe auf den Behandlungseffekt	23
4. Diskussion	26
4.1. Wachstumsverhalten nach CY und Quantifizierung der Wachstumsverzögerung	26
4.2. Besprechung der Dosiseffektkurve nach Einzel-Behandlung mit CY	27
4.3. Interpretation der Einzeldosis-Wirkungskurve	28
4.4. Zellinaktivierung durch CY	30
4.5. Fraktionierungsexperimente mit kurzen Intervallen (0 bis 24 Stunden)	34
4.6. Fraktionierungsexperimente mit langen Intervallen (0 bis 7 Tage)	38
4.7. Vergleich zu den Versuchsergebnissen am Adenocarcinom 284 der Maus	41
5. Zusammenfassung	44
6. Literatur	46

1. Einleitung

Therapiestudien an transplantablen Nagertumoren stellen ein wesentliches Bindeglied zwischen Grundlagenuntersuchungen zum Wirkungsmechanismus und der zellulären Wirkung einerseits und der klinischen Anwendung andererseits dar. In der Komplexität ihrer Zellsysteme sind transplantable Tumoren der Maus bei geeigneter Auswahl der großen Vielfalt menschlicher solider Geschwülste weitgehend ähnlich; auch die Problematik toxischer Nebenwirkungen, insbesondere auf schnell proliferierende Mausergewebe, bietet gegenüber der klinischen Situation keine grundsätzlichen Unterschiede. Hinzu kommt, daß für einige Zytostatika wegen der erst in vivo erfolgenden Aktivierung die Untersuchung in vivo unumgänglich ist.

Besondere Bedeutung kommt daher Untersuchungen zu, die sich mit dem komplexen Therapieeffekt an Tiertumoren in situ befassen.

In der hier vorgelegten Arbeit sollte bei einer Monotherapie mit Cyclophosphamid (CY) an einem transplantablen Modelltumor der Maus, dem Fibrosarkom SSK 31, neben der Wirkungsabhängigkeit von der Einzeldosis auch der Fraktionierungseffekt untersucht werden.

Cyclophosphamid, als alkylierendes Zytostatikum bereits 1958 (ENDOXAN^R) eingeführt, stellt in der Klinik bis heute eine der wirksamsten cancerotoxischen Substanzen mit breitem Therapiespektrum dar. Da sich auch im Tierexperiment durch zytostatische Behandlung sowohl in Monotherapie wie auch mit hochaggressiven Kombinations-schemata im allgemeinen keine Tumorheilung erzielen läßt, setzt die Beurteilung eine Quantifizierung der Tumorstärke voraus, die im subcurativen Bereich einen objektiven Wirkungsvergleich ermöglicht. Dieses Ziel

wird mit der Auswertung der Wachstumsverzögerung erreicht, die klinisch etwa einer dosisabhängigen Remission oder einem Wachstumsaufschub bei palliativer Behandlung entspricht.

2. Material und Methoden

2.1. Tierstamm

Als Versuchstiere wurden 7 - 8 Wochen alte, 20 bis 25 g schwere, ingezüchtete weibliche C3H-Mäuse der Linie Neuherberg verwendet. Diese Tiere wurden dankenswerterweise von der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung München-Neuherberg (GSF) zur Verfügung gestellt. Nach der Transplantation wurden die Tiere im Stall der GSF und des Physiologischen Institutes der Universität München, Pettenkoferstr. untergebracht und zu je 10 Tieren in Macrolon-Käfigen gehalten. Als Nahrung erhielten sie Standardfutter Altromin und Wasser ad libitum.

2.2. Tumorsystem

Als Tumor wurde das transplantable Fibrosarkom SSK 31 verwendet. Dieser Tumor wurde 1970 auf der Rückenhaut einer C3H-Maus durch Pinselung mit Methylcholanthren induziert und nach fortlaufender Transplantation bis zur 18. Tierpassage in flüssigem Stickstoff konserviert. Die laufenden Versuche wurden nach Retransplantation aus dem tiefgefrorenen Material mit den Passagen Nr. 24, 25 und 27 durchgeführt. Die histologische Struktur des Tumors ist sehr konstant.

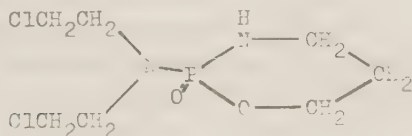
Sie entspricht einem zellreichen Fibrosarkom aus spindelligen Zellen, z.T. faszikulär verwoben, mit spärlicher Ausbildung kollagener Fasern. Bis zu einem Tumorgewicht von 100 mg werden keine oder nur sehr diskrete Nekrosen beobachtet. Der Tumor wurde zellkinetisch und strahlenbiologisch bereits ausführlich untersucht (17), (29).

Mit einer Volumenverdopplungszeit von 2 Tagen (bei der Behandlungsgröße von 100 mg), einer mittleren Zellzykluszeit von 14,6 Stunden und einer Wachstumsfraktion von 0,48 unterscheidet er sich in seinen Wachstumsparametern nicht nennenswert von den üblicherweise verwendeten Mäusetumoren.

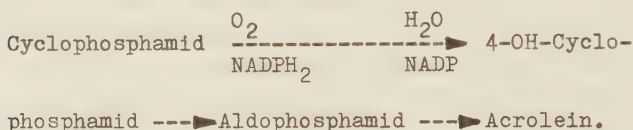
2.3. Zytostatikum

Als Zytostatikum wurde Cyclophosphamid (EMDOXAN^R) verwendet. CY ist ein Derivat des Stickstoff-Losts, das in vitro inaktiv ist und erst in vivo durch mischfunktionelle Oxidasen der Mikrosomen der Hepatozyten und zu einem sehr geringen Teil durch Giftungsreaktionen in allen übrigen Körperzellen in seine aktiven Formen umgewandelt wird (?). Im Unterschied zu aktiven Tochterprodukten wie vor allem dem 4-Hydroxy-CY, kann CY demnach nur in vivo auf seine Wirksamkeit untersucht werden.

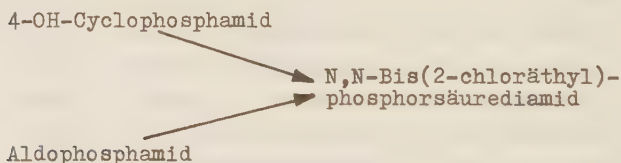
Die volle chemische Bezeichnung von Cyclophosphamid lautet: 2-((Bis-(2-chloräthyl)-amino))-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid. Seine Strukturformel ist nachfolgend wiedergegeben:



Das Aktivierungsschema in den Mikrosomen von Hepatozyten bis zur endgültigen Metabolisierung in das allgemein-toxische Acrolein verläuft nach BROCK et al. (2) und VOELCKER et al. (35) in folgenden Schritten:



In allen Körperzellen findet schließlich noch folgende Umwandlung von zirkulierenden und resorbierten Zwischenprodukten statt, deren Umfang vom Aktivitätsgrad des Zellstoffwechsels abhängt:



N,N-Bis(2-chloräthyl)-phosphorsäurediamid ist hierbei möglicherweise als die eigentliche Wirkform in einer Körperzelle anzusehen.

CY kann sowohl parenteral, als auch oral appliziert werden. In den eigenen Versuchen wurden die handelsüblichen Injektionsflaschen zu 1000 mg CY (+ 450 mg NaCl) verwendet. Die Substanz wurde unmittelbar vor Gebrauch nach Vorschrift gelöst, wobei sich alle Konzentrationsangaben auf die CY-Menge beziehen, nicht auf die Gesamtmenge mit dem NaCl. Die Dosierung erfolgte nach dem Körpergewicht der Versuchstiere, das mittels einer Tierwaage auf ein halbes Gramm genau festgestellt wurde.

Um die Dosen zu variieren, wurden verschiedene Volumina bis maximal 0,9 ml Lösung intraperitoneal mit Tuberkulinspritzen injiziert.

2.4. Transplantation des Tumors

Zur Transplantation wurde einer mit Äther getöteten Maus ein subcutan-gelegener Spendertumor mit einem Durchmesser zwischen 10 bis 12 mm (entspricht 200 - 350 mg) entnommen, mit einer Rasierklinge in ca. 1 mm³ große Würfel geschnitten und in isotone NaCl-Lösung gegeben.

Die vorher auf der rechten Thoraxseite rasierten Empfängertiere wurden mit Diäthyläther narkotisiert. Nach Desinfektion des rasierten Hautbezirkes mit 70 %igem Äthanol wurde durch Scherenschlag ein kleiner Hautschnitt gesetzt, in den ein mit dem Tumorstückchen beschickter Trokar (Durchmesser 2,5 mm) eingeführt und subcutan vorgeschoben wurde. Mit einem Mandrin wurde das Transplantat an der gewünschten Stelle, etwa subscapular, aus dem Trokar gestoßen und subcutan deponiert. Jedes Tier wurde anschließend mit einer Marke am Ohr numeriert.

Der Hautschnitt heilte bei allen Mäusen komplikationslos ab. Die Angehrate der Transplantate lag in allen Versuchsabschnitten bei etwa 95 %, wobei eine Abhängigkeit von der Größe des Spendertumors besteht, da mit der Größenzunahme vermehrt Zellnekrosen im Tumorrinnern auftreten.

2.5. Messung der Tumorgroße

Ca. 7 Tage nach der Transplantation wurde der Tumor palpabel. Von da an wurde die Tumorgroße 3 x wöchentlich mit Hilfe von Lochschablonen gemessen. Die ver-

wendeten Schablonen aus dünnem Plexiglas enthielten Bohrungen mit jeweils um 0,3 mm ansteigendem Durchmesser von 5,2 bis 16,5 mm. Es wurde jeweils diejenige Bohrung ermittelt, die ohne Druckanwendung den Tumorknoten mit Haut eben noch aufnahm. Im allgemeinen hatten die Tumoren sowohl unbehandelt wie im Wiederwachstum nach Therapie eine kugelige Gestalt. Aber auch bei mäßiger Abweichung von der Kugelform war die Messung noch zuverlässig durchzuführen.



Abb. 1 : C3H-Maus mit einem ca. 3 Wochen alten Transplantattumor. Daneben die zur Größenmessung verwendete Schablone (Eichung in mg Tumorgewicht).

Dieses Verfahren, das von STEEL (24) angegeben wurde, liefert zunächst als Meßgröße einen Kreisdurchmesser bzw. eine Kreisfläche und bedingt eine Eichkurve, wenn

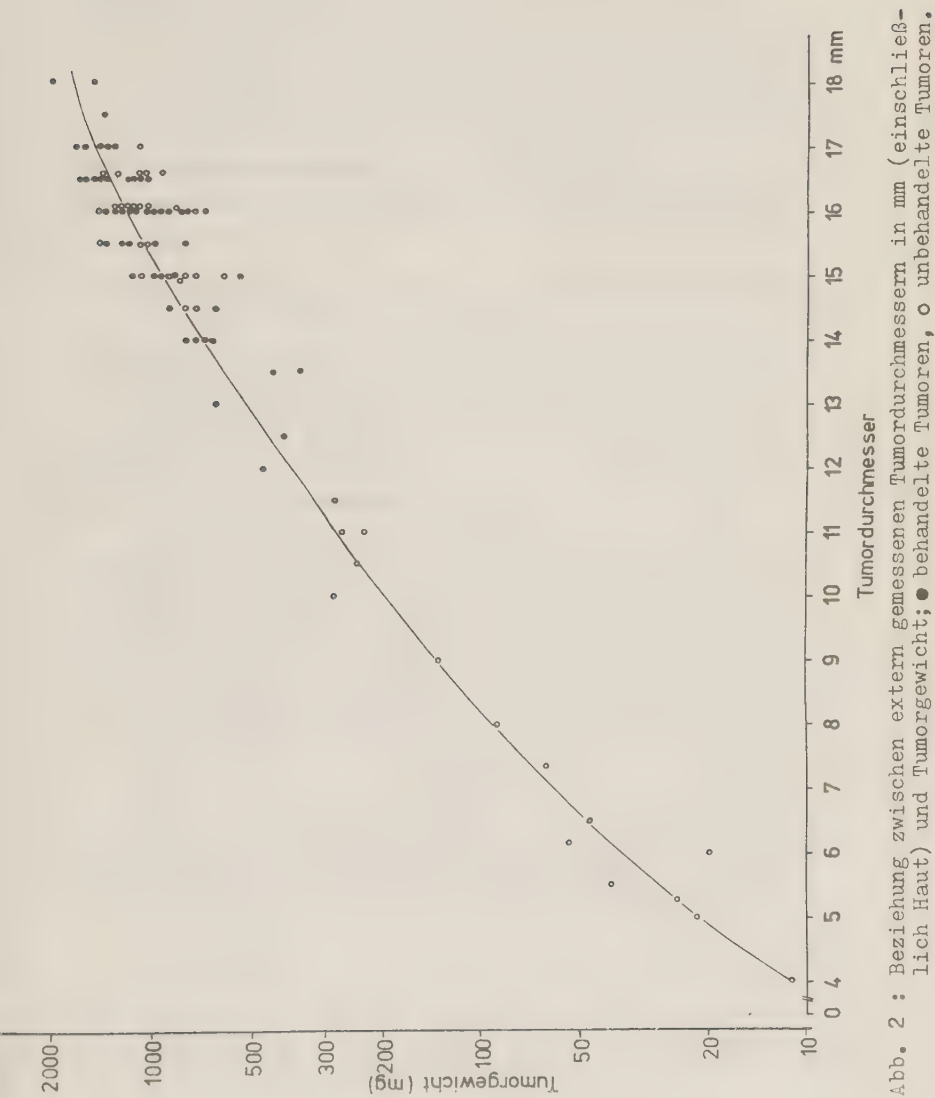


Abb. 2 : Beziehung zwischen extern gemessenen Tumordurchmessern in mm (einschließlich Haut) und Tumorgewicht; ○ behandelte Tumoren, ● unbehandelte Tumoren.

für die Durchmesser äquivalente Tumormassen wiedergegeben werden sollen. Die notwendigen Kalibrierungsmessungen wurden an einer großen Zahl von unbehandelten und behandelten Tumoren durchgeführt, wobei der Tumor jeweils nach der Durchmesserbestimmung aus dem getöteten Versuchstier präpariert, von adhärentem Fett- und Bindegewebe befreit und auf einer Feinwaage auf mg ausgewogen wurde. Zur Erstellung der Eichkurve wurde der Logarithmus der Tumormasse gegen den Durchmesser aufgetragen (Abb. 2).

2.6. Kriterien für die Auswahl des Versuchsmaterials

Um im Versuchsmaterial zu große Inhomogenitäten hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren auszuschließen, wurden nur Mäuse in die Versuche einbezogen, deren Tumoren im Zeitraum von 11 bis 14 Tagen nach Transplantation einen Durchmesser von $8,0 \pm 1,0$ mm (genau von 7,1 bis 9,2 mm) erreichten. Dieser Bereich entspricht einer Tumormasse von ca. 60 bis 145 mg. Das Mindestgewicht einer Maus bei Behandlungsbeginn wurde auf 20 g festgelegt. Die Versuchstiere einschließlich der unbehandelten Kontrolltiere wurden beim Erreichen der Versuchsgröße in Gruppen randomisiert, deren Nummern gleiche Endziffern hatten, z.B.:
1, 11, 21, 31 ... = Gruppe 1
2, 12, 22, 32 ... = Gruppe 2
Pro Versuch erreichten mehr als 60 % der transplantierten Tumoren die Versuchsgröße, wobei Gruppen mit 8 bis 13 Tieren gebildet werden konnten.

2.7. Versuchsaufbau

2.7.1. Toxizitätsbestimmung von CY

Zur Ermittlung der mittleren Letaldosis $LD_{50/30}$ für CY wurden an 10 Wochen alten, nicht tumortragenden weiblichen C3H-Mäusen Toxizitätsversuche durchgeführt. Die Versuchstiere wurden in 7 Gruppen mit je 10 Mäusen eingeteilt, die CY-Einzeldosen von 280 bis 690 mg/kg erhielten. Das Absterben der Tiere wurde bis zum 72. Tag verfolgt.

2.7.2. Behandlung tumortragender Tiere mit CY-Einzeldosen

Für die Versuche mit einer einmaligen Injektion wurden Gruppen von je 8 - 13 Versuchstieren mit CY-Einzeldosen von 70, 140, 210, 280 und 350 mg/kg behandelt. Eine zusätzliche Gruppe wurde als unbehandelte Kontrolle ausgewählt.

2.7.3. Fraktionierte Behandlung mit CY

Eine fraktionierte Behandlung mit CY erfolgte durch die Aufteilung einer Gesamtdosis von 280 mg/kg in zwei gleichgroße Einzelinjektionen von 140 mg/kg. Dieser Versuch wurde in zwei Reihen durchgeführt, die sich durch das Therapieintervall unterscheiden. Die Intervalle betragen im Fraktionierungsversuch A : 1, 6 und 24 Std. bei 8 - 13 Mäusen pro Gruppe, im Versuch B : 1, 2, 3, 4 und 7 Tage bei 8 - 12 Mäusen pro Gruppe. Zusätzlich wurde im Versuch A für eine Gruppe tumortragender Mäuse eine weitergehende Fraktionierung in Form von 4 Einzelinjektionen zu je 70 mg/kg in stündlichem Abstand getestet. In den Versuchen A und B wurde je eine unbehandelte Gruppe von Versuchstieren als Kontrollgruppe mitgeführt. Darüberhinaus wurde sowohl in A als auch in B je eine Versuchsgruppe mit einer Einzeldosis von 280 mg/kg mitgetestet (Fraktionierungsintervall 0).

2.8. Graphische und rechnerische Auswertung der Behandlungseffekte

Aus den Werten der unter 2.5. beschriebenen Tumorgroßmessungen wurden für jeden behandelten und unbehandelten Tumor in halblogarithmischer Darstellung der Tumorgroße gegen die Zeit eine individuelle Wachstumskurve erstellt, wobei die Wachstumskontrolle sich bis zu einer Größe von ca. 16,5 mm Tumordurchmesser erstreckte, da an größeren Tumoren häufig Exulcerationen und Verwachsungen mit der Unterlage und der Haut beobachtet wurden.

2.8.1. Ermittlung der Wachstumsverzögerung

Aus diesen Wachstumskurven der einzelnen Tumoren wurde als Maß des Therapieeffektes die Wachstumsverzögerung graphisch abgegriffen. Sie ist nach THOMLINSON und CRADDOCK (28) als das Zeitintervall definiert, das ein behandelter Tumor zusätzlich gegenüber der unbehandelten Kontrolle benötigt, um eine bestimmte vorgegebene Größe zu erreichen. Diese vorgegebene Größe ("endpoint") war im vorliegenden Fall das 1,53fache der Ausgangsdurchmesser. Nach der Eichkurve (Abb. 2) entspricht das etwa dem 5fachen Ausgangsgewicht des Tumors.

2.8.2. Quantifizierung des Dosiseffektes

Innerhalb jeder Behandlungsgruppe wurde aus den individuellen Werten der Wachstumsverzögerung der Mittelwert berechnet. Dabei ist das arithmetische Mittel der Einzelwerte anfällig für Extremwerte mit langer Wachstumsverzögerung. Ein besseres Maß für den mittleren Therapieeffekt stellt der geometrische Mittelwert dar, da die Verteilung der individuellen Werte beim Fibrosarkom SSK 31 (17) angenähert durch eine log-Normalverteilung wiedergegeben wird. Die Medianwerte und die Stan-

dardabweichung des Medianwertes (= Standard Error of the Mean) wurden mit einem programmierbaren Taschenrechner berechnet.

Das graphische Abgreifen der Wachstumsverzögerung aus individuellen Wachstumskurven soll folgende Skizze veranschaulichen:

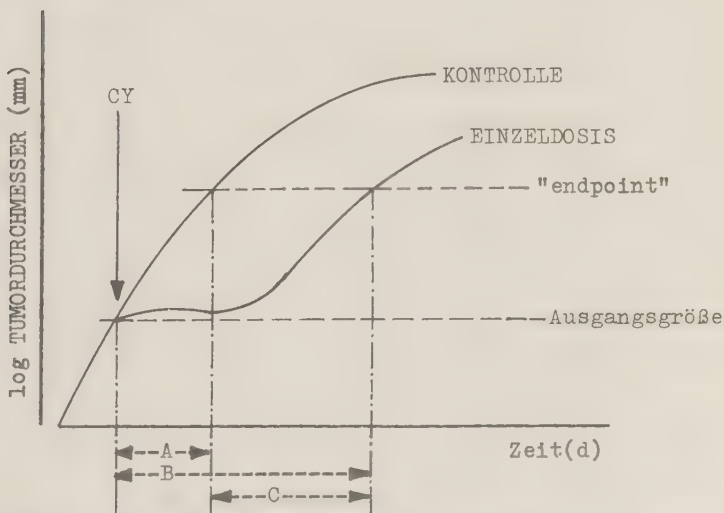


Abb. 3 : Skizze zur graphischen Bestimmung der Wachstumsverzögerung.

- A: Wachstumsdauer der unbehandelten Kontrolle bis zum vorgegebenen "endpoint" (in Tagen),
- B: Wachstumsdauer eines behandelten Tumors bis zum vorgegebenen "endpoint" (in Tagen),
- C = B minus A: CY-induzierte Wachstumsverzögerung des Tumors (in Tagen).

2.8.3. Volumenwachstumskurven nach CY-Einzeldosen

Um den mittleren Wachstumsverlauf von Tumoren nach Einzeldosen von CY auch graphisch übersichtlich darzustellen, wurden für jede Dosisgruppe mediane Wachstumskurven erstellt. Hierzu wurde der geometrische Mittelwert der Tumorgöße und seine Abweichung (Standard Error)

zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung berechnet und gegen die Zeit aufgetragen.

3. Ergebnisse

3.1. Toxizität nach Einzeldosen von CY

Den Mortalitätsverlauf nach CY-Einzeldosen bei weiblichen C3H-Mäusen der Linie Neuherberg zeigt die Abb. 4. Hieraus geht hervor, daß Dosen von 690 und 620 mg/kg sofort nach der Applikation letal wirkten; dies erklärt sich nicht aus einer zytoletalen Wirkung auf Darm- und Knochenmarkszellen mit ihren pathogenetischen Folgen, sondern aus der unmittelbaren toxischen Wirkung des aufgespaltenen Heterozyklus (34). Bei den Dosen 550 mg/kg waren nach 7 Tagen und bei 480 mg/kg nach 12 Tagen alle Versuchstiere tot. Bis zum 30. Tag betrug die Überlebensrate bei 420 mg/kg 30 %, bei 350 mg/kg noch 70 %. Vom 30. bis zum 72. Tag zeigte sich für beide Dosen keine Veränderung mehr. Eine Dosis von 280 mg/kg überlebten stets alle Versuchstiere.

Die Dosis-Letalitätskurve für die 30 Tage-Mortalität zeigt in linearer Darstellung (Abb. 5) einen sigmoiden Kurvenverlauf mit einer $LD_{50/30}$ von 385 mg/kg CY. Trotzdem waren im Therapieversuch bei 350 mg/kg als höchste verwendete Einzeldosis nach maximaler Beobachtungszeit keine Verluste von Tieren zu verzeichnen.

3.2. Kalibrierungskurve

Die Beziehung zwischen dem extern bestimmten Tumordurchmesser und der tatsächlichen Tumormasse zeigt die

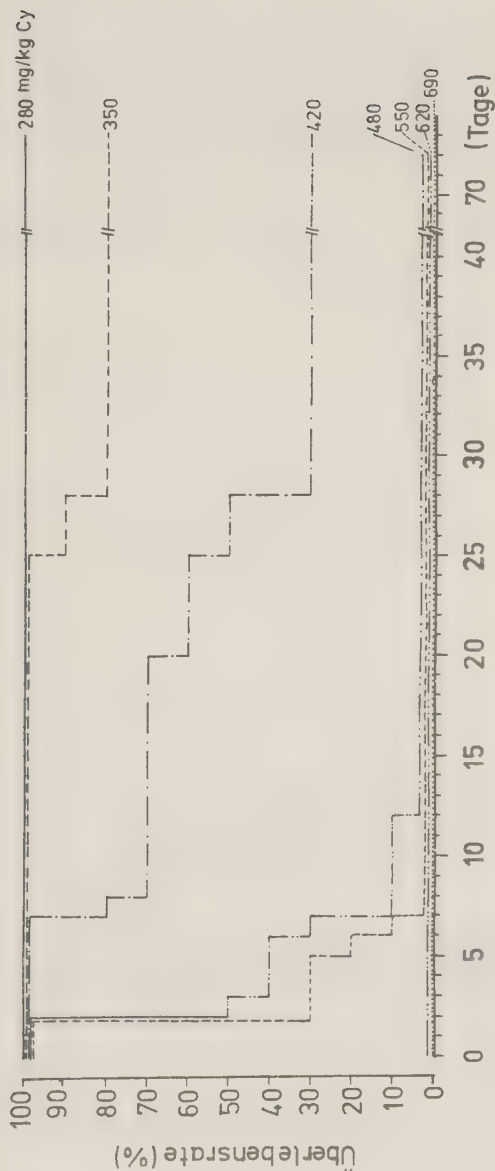


Abb. 4 : Absterbekurve weiblicher C3H-Mäuse/Linie Neuherberg nach Applikation von CY-Einzeldosen

Kurve in Abb. 2. In dieser Kurve geht sowohl der mit steigender Tumorgröße abnehmende Einfluß der Hautdicke, wie auch größenunabhängige Formänderungen des Tumors ein. Sie ist daher als weitgehend empirische Eichkurve anzusehen. Neben den unbehandelten Tumoren wurden zum Vergleich auch alle behandelten Tumoren nach Abschluß der Beobachtungszeit durch terminale Wägung auf Übereinstimmung mit der externen Größenmessung kontrolliert und in Abb. 2 eingetragen.

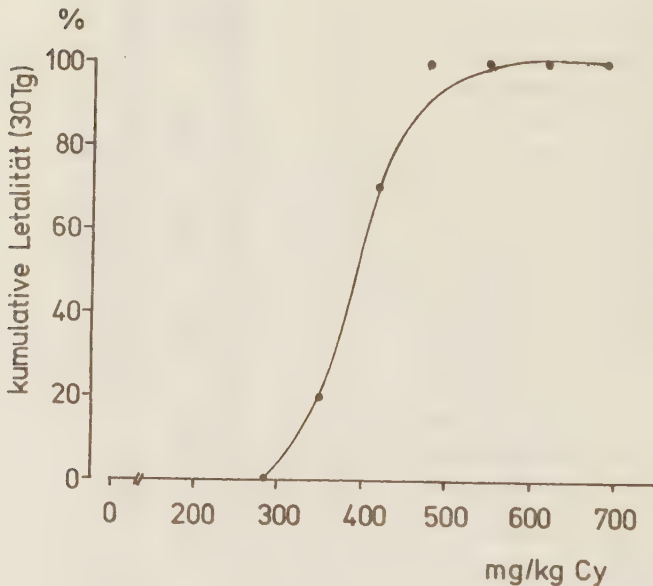


Abb. 5 : Kumulative Letalität bis zum 30. Tag nach Applikation von CY-Einzeldosen bei weiblichen C^{3H} -Mäusen der Linie Neuherberg.

3.3. Wirkung von CY-Einzeldosen auf den Tumor

3.3.1. Wachstumsverhalten behandelter Tumoren

Einen Überblick über den Wachstumsverlauf des Tumors nach Behandlung mit CY-Einzeldosen gibt die Abb. 6.

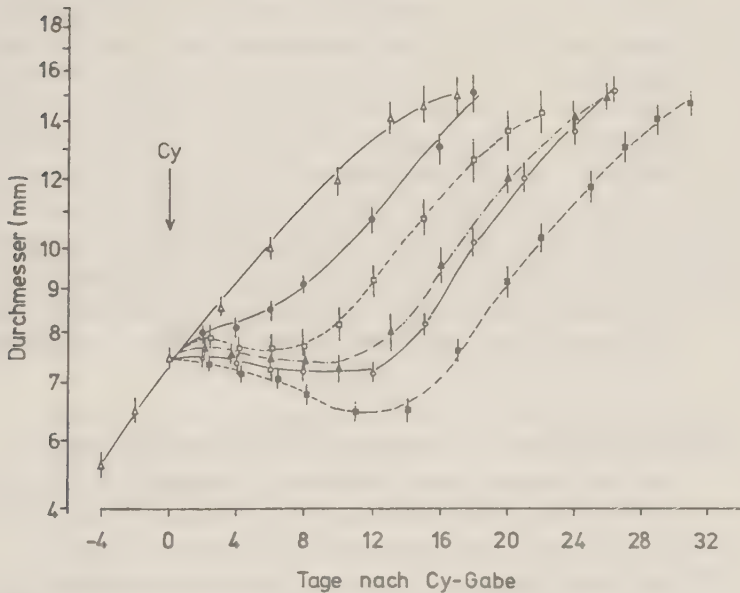


Abb. 6 : Wachstumsverhalten des Fibrosarkoms SSK 31 nach CY-Einzeldosen von 0 bis 350 mg/kg.
△ Kontrolle, ● 70, □ 140, ▲ 210, ○ 280 mg/kg und ■ 350 mg/kg.

Die Kontrollkurve zeigt, daß der unbehandelte Tumor eine Verdopplungszeit (T_D) von 3,5 Tagen zur Zeit der Behandlungsgröße hat. Die T_D nimmt über den beobachteten Wachstumsverlauf stetig zu, d.h. die Wachstumsrate nimmt mit zunehmender Größe ab. Das Wachstum des Tumors weicht somit von einem rein exponentiellen Wachstum ab. Die durchschnittliche Zeit, die der unbe-

handelte Tumor benötigt, um von der Behandlungsgröße aus die 5 fache Tumorgroße bzw. den 1,53 fachen Ausgangsdurchmesser ("endpoint") zu erreichen, beträgt auch in dieser Darstellung ca. 9 Tage.

Die Tumoren der behandelten Versuchstiere erfuhren alle eine Wachstumshemmung. Bei den niedrigeren Dosen (70,140 und 210 mg/kg) ist kurz nach der Injektion noch eine leichte Tumorumfangszunahme zu verzeichnen, dann folgt ein mit zunehmender Dosis länger werdender Wachstumsstillstand, nach dem der Tumor wieder parallel zur Kontrolle wächst. Bei höheren Dosen (280 mg/kg) stagniert die Umfangszunahme sofort nach der Therapie und bei 350 mg/kg fällt das Tumorumfang auf 85 % seines Ausgangsvolumens ab, entsprechend der Tumorgroße 1,5 Tage vor Behandlung. Nach einer dosisabhängigen Latenzzeit treten alle Kurven in eine eindeutige Phase des Rezidivwachstums ein und verlaufen dann wieder annähernd parallel zur Kontrolle.

3.3.2. Dosiswirkungsbeziehung der Wachstumsverzögerung

Die Einzelwerte der Wachstumsverzögerung aller Tumoren sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Zieht man von den berechneten Medianwerten die Wachstumsverzögerung der Kontrolle ab, erhält man die Netto-Wachstumsverzögerung. Aus diesen korrigierten Medianwerten wurde eine Dosis-effektkurve in linearer Darstellung gezeichnet (Abb. 7). Der Verlauf dieser Kurve läßt sich im wesentlichen als spiegelbildlich sigmoid beschreiben. Der Anfangsteil steigt zunächst steil an und zeigt damit eine relative starke Hemmung des Tumorumfangs an. Unter stetiger Abflachung erreicht die Kurve dann zwischen 210 und 280 mg/kg einen Wendepunkt. Mit weiter zunehmender Dosis nimmt ihre Steigung wieder zu, doch läßt sich dieser Trend wegen der Allgemeintoxizität des CY nicht

Dosis (mg/kg)	n	Wachstumsdauer bis zum Erreichen des 1,53fachen Ausgangsdurchmessers. Medianwert in Tagen ($\pm$ Standard Error)	Wachstumszeit von 10-15 mm (Tage)
0	16	8,42 $\pm$ 0,54	8,16 $\pm$ 1,46
70	10	13,12 $\pm$ 0,99	9,08 $\pm$ 1,44
140	10	16,53 $\pm$ 0,69	8,79 $\pm$ 1,83
210	11	19,49 $\pm$ 0,58	8,81 $\pm$ 2,48
280	9	21,21 $\pm$ 0,95	7,77 $\pm$ 1,37
350	11	24,71 $\pm$ 0,81	8,89 $\pm$ 1,18

Tab. 1 : Wirkung von CY-Einzeldosen auf das Tumorwachstum.

Die Wachstumsdauer bis zum Erreichen des 1,53fachen Ausgangsdurchmessers stellt die Gesamtlatenzzeit (Wachstumszeit der Kontrolle plus eigentliche therapieinduzierte Verzögerung) dar. Die Wachstumszeit von 10 auf 15 mm Durchmesser ist ein Maß für eventuelle therapieinduzierte Veränderungen der Rezidivwachstumsgeschwindigkeit (Siehe 3.5.).

über 350 mg/kg hinaus verfolgen. Alle Wachstumsverzögerungswerte der verschiedenen Einzeldosen sind untereinander signifikant verschieden.

Dieser Kurvenverlauf läßt sich auch in Form der " pro Tag zusätzlicher Verzögerung benötigten Dosis " beschreiben: Zwischen 70 und 210 mg/kg wird eine zusätzliche Verzögerung von einem Tag mit einer Dosissteigerung von rund 22 mg/kg erreicht. Zwischen 210 und 280 mg/kg braucht man dafür 41 mg/kg und zwischen 280 und 350 mg/kg nur 20 mg/kg CY.

3.4. Wirkung fraktionierter Dosen auf das Tumorwachstum

3.4.1. Fraktionierungsintervalle 0 bis 24 Stunden

Die Einzelwerte der Wachstumsverzögerung für die Fraktionierungsintervalle 0 - 24 Std. und die daraus

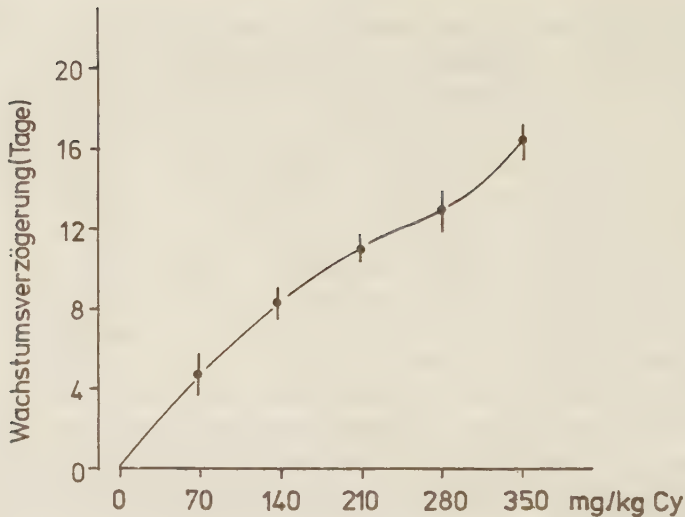


Abb. 7 : Dosiswirkungsbeziehung der Wachstumsverzögerung des Fibrosarkoms SSK 31 bei Behandlung mit CY-Einzeldosen. Aufgetragen ist die Netto-Wachstumsverzögerung gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

Intervall	n	Wachstumsdauer bis zum Erreichen des 1,53fachen Ausgangsdurchmessers. Medianwert in Tagen ($\pm$ Standard Error)	Wachstumszeit von 10-15 mm (Tage)
Kontrolle (unbehandelt)	8	8,89 $\pm$ 0,81	11,58 $\pm$ 2,09
0 Std. (280 mg/kg)	10	22,94 $\pm$ 0,85	10,71 $\pm$ 2,73
1 Std. (2x140 mg/kg)	11	23,29 $\pm$ 0,82	9,58 $\pm$ 1,69
6 Std.	13	19,32 $\pm$ 0,79	9,67 $\pm$ 2,16
24 Std.	13	21,49 $\pm$ 0,76	9,98 $\pm$ 2,04
3x1 Std. (4x 70 mg/kg)	13	21,40 $\pm$ 1,00	8,87 $\pm$ 1,55

Tab. 2 : Wirkung einer Kurzzeitfraktionierung von CY auf das Tumorstadium. Wiedergegeben ist wie in Tab. 1 die Gesamtwachstumsverzögerung und die spätere Rezidivwachstumsgeschwindigkeit.

Intervall	n	Wachstumsdauer bis zum Erreichen des 1,53fachen Ausgangsdurchmessers. Medianwert in Tagen ($\bar{x}$ Standard Error)	Wachstumszeit von 10-15 mm (Tage)
Kontrolle (unbehandelt)	9	7,35 $\pm$ 1,00	7,02 $\pm$ 1,71
0 Tage (280 mg/kg)	8	17,77 $\pm$ 0,53	7,48 $\pm$ 3,15
1 Tag (2x140 mg/kg)	12	18,78 $\pm$ 0,93	7,38 $\pm$ 1,72
2 Tage	12	19,52 $\pm$ 0,86	7,75 $\pm$ 2,80
3 Tage	11	19,94 $\pm$ 0,50	7,47 $\pm$ 1,52
4 Tage	11	20,66 $\pm$ 0,76	7,67 $\pm$ 1,97
7 Tage	9	23,22 $\pm$ 0,97	8,08 $\pm$ 2,20

Tab. 3 : Wirkung einer Langzeitfraktionierung von CY auf das Tumorstadium. Wiedergegeben ist wie in Tab. 1 und 2 die Gesamtwachstumsverzögerung und die spätere Rezidivwachstumsgeschwindigkeit.

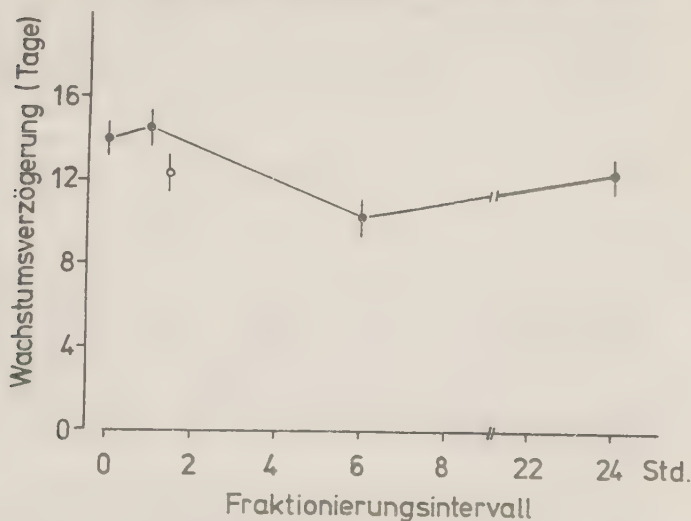


Abb. 8 : Wachstumsverzögerung nach 2 x 140 mg/kg CY in Abhängigkeit von der Dauer des Fraktionierungsintervalls. O Std.-Wert: 280 mg/kg als Einzelinjektion, o: 4 x 70 mg/kg mit stündlichem Intervall.

berechneten Medianwerte sind in Tabelle 2 aufgelistet. In Abb. 8 ist die Abhängigkeit vom Fraktionierungsintervall graphisch dargestellt.

Die Wachstumsverzögerung nach Einzelinjektion von 280 mg/kg CY beträgt in diesem Versuch nach Abzug des Kontrollwertes 14 Tage. Dieser Wert unterscheidet sich nicht signifikant von dem 1 Std.-Intervall, das mit einer Verzögerung von 14,4 Tagen eine etwas größere Hemmwirkung auf das Tumorstadium aufweist. Das 6 Std.-Intervall dagegen zeigt sich mit einer Verzögerung von 10,4 Tagen signifikant weniger wirksam gegenüber der Einzelinjektion und allen anderen Intervallen. Eine Verlängerung der Intervallpause auf 24 Std. zeigt wieder eine leichte Zunahme des Effektes auf 12,6 Tage. Dieser Wert liegt zwischen dem 1 Std.- und 6 Std.-Intervall und unterscheidet sich von beiden signifikant.

Mit der Aufteilung der Gesamtdosis 280 mg/kg auf vier Einzeldosen zu je 70 mg/kg ergab sich bei stündlichem Intervall ein Verzögerungswert von 12,5 Tagen, der etwa dem 24 Std.-Intervall entspricht. Mit dieser Protraktion wurde danach keine Verbesserung der therapeutischen Wirksamkeit erreicht.

3.4.2. Fraktionierungsintervalle 0 bis 7 Tage

In der Tabelle 3 sind die Medianwerte der Wachstumsverzögerung nach Behandlung mit 2 x 140 mg/kg bei Intervallen bis 7 Tage wiedergegeben. Die Abhängigkeit der Netto-Wachstumsverzögerung vom 0 bis 7 Tage-Fraktionierungsintervall ist in Abb. 9 graphisch dargestellt.

Der Effekt der Einzeldosis von 280 mg/kg CY war in diesem Versuch mit einer Verzögerung von 10,3 Tagen geringer als bei den vergleichbaren Einzelinjektionen von 280 mg/kg im Einzeldosis-Versuch (12,8 d) und bei den kurzen Fraktionierungsintervallen (14,0 d).

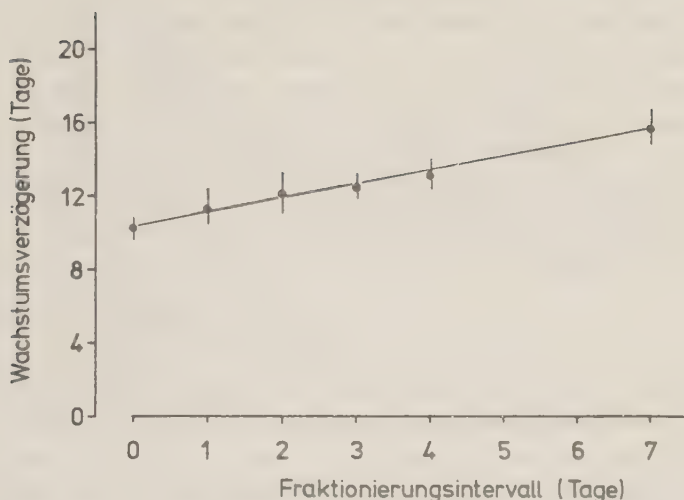


Abb. 9 : Wachstumsverzögerung vom Zeitpunkt der Erstdosis an gerechnet nach $2 \times 140 \text{ mg/kg CY}$ in Abhängigkeit von der Dauer des Fraktionierungsintervalls. Intervall 0-Tage: 280 mg/kg CY als Einzelinjektion.

Bezogen auf den versuchsinternen Wert von 10,3 Tagen zeichnet sich mit Zunahme der Intervalldauer ein kontinuierlicher Anstieg der Wachstumsverzögerung bis zum 7 Tage-Intervall mit einem Wert von 15,9 Tagen ab. Die Verzögerungszunahme pro Tag Intervallsteigerung liegt mit kleinen Fluktuationen zwischen 0,7 und 1,0 Tagen der Wachstumsverzögerung. Nur das 3 Tage-Intervall hat mit 0,4 Tagen einen geringeren Effektzuwachs. Die Werte der Intervalle von 0, 1, 2, 3 und 4 Tagen überlappen sich in ihren Signifikanzen. Allein der 7 Tage-Wert liegt mit 2,6 Tagen zusätzlicher Verzögerung signifikant über dem 4 Tage-Wert und somit auch signifikant über allen kürzeren Intervallen (0 - 4 Tage).

Im Vergleich aller fraktionierten Protokolle mit einer

Gesamtdosis von 280 mg/kg ergibt sich mit dem 7 Tage-Intervall die größte Wachstumsverzögerung, d.h. den stärksten Tumorhemmeffekt. Bei gleicher Gesamtdosis von 280 mg/kg CY ist der Verzögerungseffekt beim 7 Tage-Intervall mit 15,9 Verzögerungstagen etwa so groß wie die Summe der Effekte von zwei Einzeldosen von 140 mg/kg CY mit je einer Verzögerung von 8,1 Tagen. Eine Einzelinjektion von 280 mg/kg CY besitzt demnach nur 66 % des Effektes der fraktionierten Gabe von 2×140 mg/kg CY im 7 Tage-Abstand.

3.5. Wachstumsgeschwindigkeit behandelter Tumoren

Abb. 10 gibt die Wachstumsgeschwindigkeit von 10 auf 15 mm Tumordurchmesser entsprechend einer Tumolvolumenzunahme von ca. 200 auf 800 mg bei behandelten Tumoren wieder, nachdem sie eine vorübergehende Hemmung durch CY erfahren haben. Im Vergleich dazu wurde die jeweilige unbehandelte Kontrolle der Versuchsgruppen aufgetragen. Die Werte sind in Tab. 1 bis 3 aufgelistet.

Der Einzeldosis-Versuch, sowie die Fraktionierungsversuche mit kurzen und langen Intervallen zeigen sowohl zwischen den Versuchsreihen, als auch innerhalb der Versuche gegenüber der Kontrolle keine signifikanten Unterschiede in der Zeitdauer, die sie zu einer Zunahme des Durchmessers von 10 auf 15 mm benötigen. Die behandelten Tumoren wachsen demnach - unabhängig von der Dosis und zeitlichen Fraktionierung - nach vorübergehender Hemmung wieder mit gleicher Geschwindigkeit weiter, wie unbehandelte Tumoren gleicher Größe das tun.

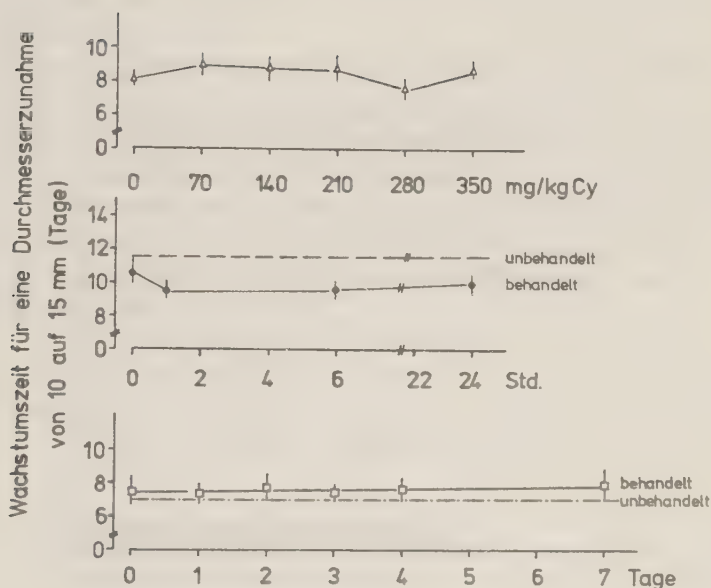


Abb. 10 : Wachstumsgeschwindigkeit des rezidivierenden Fibrosarkoms nach verschiedenen Behandlungsmodi. Dargestellt ist die Wachstumszeit für eine Größenzunahme des Tumors von 10 auf 15 mm Durchmesser. Jeder Punkt stellt das geometrische Mittel $\pm$ S.E. einer Gruppe von je 8 - 16 Mäusen dar.

Oben: Einzeldosen von 0 - 350 mg/kg CY;

Mitte: Fraktionierte Behandlung mit 2x140 mg/kg CY bei einem Fraktionierungsintervall 0 - 24 Std.;

Unten: 2x140 mg/kg CY, Fraktionierungsintervall 0 - 7d.

3.6. Einfluß der Tumorausgangsgröße auf den Behandlungseffekt

Die aus praktischen Gründen akzeptierte Variabilität der Tumorgroße bei Behandlung lag in einem Bereich des Durchmessers von 7,1 bis 9,2 mm (Mittel: 8,0 mm). Dazu stellt sich die Frage, ob die Differenz zwischen den kleinsten und größten Ausgangsgrößen sich im Therapie-

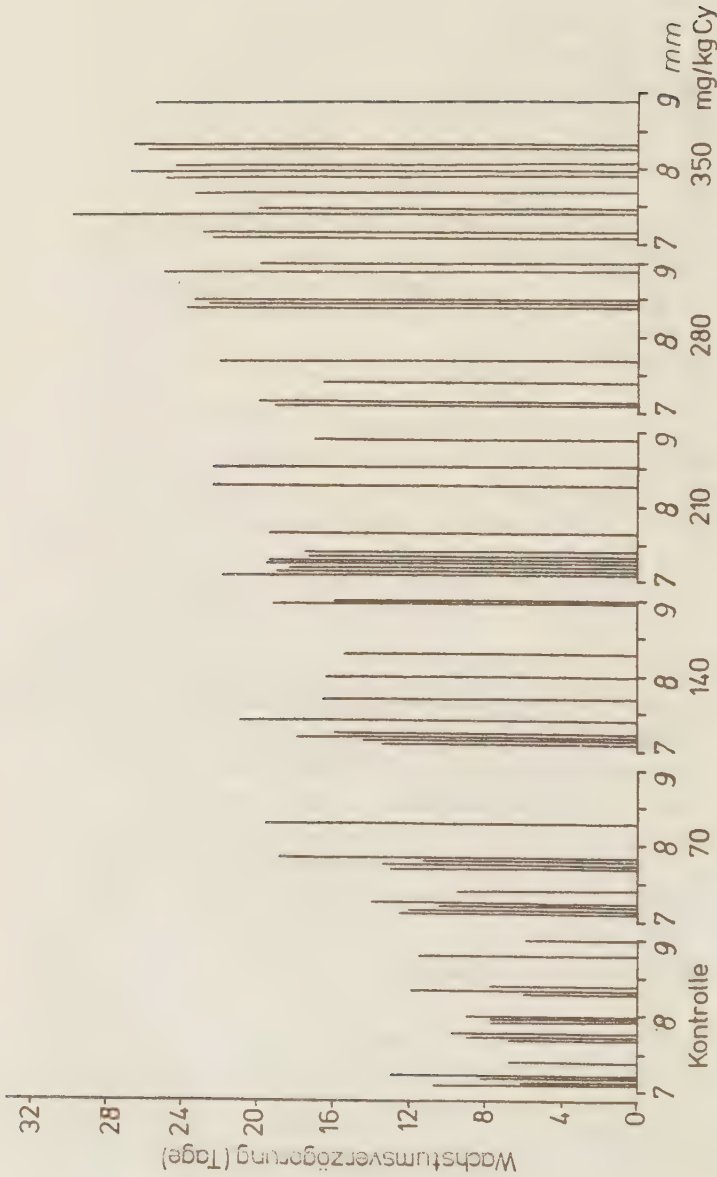


Abb. 11 : Wachstumsverzögerung des Fibrosarkoms SSK 31 nach CY-Einzeldosen in Abhängigkeit von der Tumorausgangsgröße (Durchmesser in mm). Als Wachstumsverzögerung ist hier die Gesamtlatenzzeit bis zum Erreichen des 1,53fachen Tumordurchmessers ("endpoint") aufgetragen.

ergebnis bemerkbar macht, d.h. ob relativ größere Ausgangstumoren auf eine gleiche Dosis anders reagieren würden als kleinere.

In Abb. 11 wurde für das Fibrosarkom SSK 31 die Beziehung zwischen Ausgangsdurchmesser und Wachstumsverzögerung für Einzeldosen von CY graphisch dargestellt.

Eine fragliche Abhängigkeit besteht allenfalls für die Dosisgruppen 280 und 350 mg/kg. Beide Gruppen sind jedoch bezüglich des Tumordurchmessers so gleichmäßig besetzt, daß sich keine Folgerungen für den medianen Behandlungseffekt ergeben.

4. Diskussion

4.1. Wachstumsverhalten nach CY und Quantifizierung der Wachstumsverzögerung

Die Quantifizierung der Tumorwirkung von CY in situ setzt ein Verfahren voraus, mit dem auch subkurative Behandlungsmaßnahmen sicher erfaßt und nach einem therapierelevanten Kriterium ausgewertet werden können. Als breit anwendbare Methode in diesem Sinn wurde von THOMLINSON und CRADDOCK (28) bereits 1967 die sogenannte "Methode der Wachstumsverzögerung" zur Quantifizierung subkurativer Strahlendosen eingeführt. Sie basiert im wesentlichen auf der Auswertung therapieinduzierter Wachstumsstörungen von Tumorwachstumskurven, die sich gewinnen lassen. Die Erfahrung mit einer Vielzahl von Tumorsystemen hat übereinstimmend gezeigt, daß hierbei nicht die initiale Volumenreaktion des Tumors, also beispielsweise die Regressionsgeschwindigkeit oder das Ausmaß der Tumorschrumpfung herangezogen werden können, sondern daß vor allem die Zeit bis zum Beginn eines eindeutigen Wiederwachstums als dosisabhängiger und von der Zahl überlebender Zellen abhängiger Parameter verwendet werden kann. Diese Latenzzeit, also die zeitliche Versetzung der Wachstumskurven, wird als Wachstumsverzögerung definiert.

Nur in seltenen Fällen werden jedoch nach lokaler Bestrahlung Rezidivwachstumskurven beobachtet, die in ihrer Wachstumskinetik dem Kontrollwachstum völlig entsprechen; in der Mehrzahl wird nach der dosisabhängigen Latenzzeit auch eine Verlangsamung des Rezidivwachstums beobachtet, die als Ausdruck einer Tumorbett-Schädigung gedeutet wird (1,28). Nach zytostatischer Behandlung wird dieser Effekt nur vereinzelt beobachtet (22),

meist tritt er nicht auf (6,30).

Für die praktische Auswertung bedeutet dies die Festlegung auf eine bestimmte Rezidivgröße, bei der dosis-einheitlich ein Vergleich der Wachstumsverzögerung vorgenommen werden kann. Im Fall des Fibrosarkoms muß dies ein "endpoint" sein, der deutlich über der Tumorgröße bei Behandlung liegt. Die mangelnde Schrumpfungsneigung dieses Tumors nach Bestrahlung (29) aber auch nach CY deutet darauf hin, daß inaktivierte Tumorzellen lange im Tumor liegen bleiben oder zumindest daß der Zelltod nicht mit einer Auflösung und schnellen Abräumung einhergeht. Andererseits verlaufen im vorliegenden Fall die Wachstumskurven rezidivierender Tumoren mit einer Geschwindigkeit, die dem Kontrollwachstum exakt entspricht. Als relevanter "endpoint" für den Dosisvergleich kann somit jede Rezidivgröße gewählt werden, die in diesem Wachstumsabschnitt liegt.

Im vorliegenden Fall wurde als "endpoint" das Erreichen der 5 fachen Tumorausgangsgröße gewählt und die hierzu benötigte Zeit (Wachstumsverzögerungszeit) als Maß des Behandlungseffekts quantifiziert.

4.2. Besprechung der Dosiseffektkurve nach Einzelbehandlung mit CY

Die nach diesem Kriterium erstellte Dosiswirkungsbeziehung für Einzeldosen von CY (Abb. 7) zeigt einen ange-deutet sigmoiden Verlauf, der nach steilem Beginn eine Abflachung im Dosisbereich bei 210 mg/kg und anschlies-send wieder eine zunehmende Aufsteilung aufweist. Die einzelnen Abschnitte dieser Kurve lassen sich auch durch die differentielle Dosiswirkung, d.h. durch die zusätz-lich erreichte Wachstumsverzögerung pro Dosisinkrement ausdrücken. Diese spezifische Wirksamkeit ist bei 70 mg/kg 0,61 d/10mg, bei 210 mg/kg 0,34 d/10mg und bei 350 mg/kg 0,64 d/10mg.

Ein linearer Kurvenverlauf, also eine lineare Regression durch alle Dosispunkte kann ebenfalls versucht werden. In diesem Fall ergibt die Neigung der Regressionsgeraden eine spezifische Wirksamkeit von 0,5 d pro 10 mg/kg CY. Die Kurve verläuft dann allerdings außerhalb der Mittelwertsstreuungen von 3 der insgesamt 5 Dosispunkte. Da definitionsgemäß der Mittelwertsfehler aussagt, daß in ihm 68 %, also etwa $2/3$ der Mittelwerte enthalten sind, ist bei gleicher Wichtung aller Dosispunkte dieser Verlauf eher abzulehnen. Der sigmoide Verlauf der Wachstumsverzögerung nach CY scheint darüber hinaus breitere Gültigkeit zu besitzen. Er wurde in ähnlicher Form sowohl für das gleichzeitig untersuchte Adenokarzinom 284 (6) wie für das Harding-Passey-Melanom der Maus (KUMMERMEHR, unveröffentlicht) gefunden.

4.3. Interpretation der Einzeldosis-Wirkungskurve

Dosiswirkungskurven der Wachstumsverzögerung nach zytototaler Behandlung sind im allgemeinen komplex. Für die Interpretation ist grundsätzlich zu beachten, daß nicht nur ein dosisabhängiger Effekt beteiligt ist. Das Erreichen einer vorgegebenen Rezidivgröße bedeutet in erster Näherung eine effektive Vermehrung von Tumorzellen, die sich aus den überlebenden Tumorzellen nachbilden. Die Überlebensrate von Tumorstammzellen und somit die zelluläre Empfindlichkeit in situ wird daher als wesentlicher Faktor eingehen. Als weiterer Faktor wird die effektive Proliferationsgeschwindigkeit der überlebenden Zellen, eine Resultante aus Zellprodukt und Zellverlust eine wesentliche Rolle spielen, aber auch gewebliche Veränderungen wie eine Erhöhung des Nekroseanteils. Sowohl die initiale Zellinaktivierung wie auch die entscheidenden Abschnitte der Repopulierung, die sich in der subklinischen Phase des Rezidivwachstums ab-

spielen, sind dabei der unmittelbaren Beobachtung entzogen.

Eine stark vereinfachte Betrachtung der Dosiswirkungskurve der Wachstumsverzögerung ist von LIN und BRUCE vorgeschlagen worden (19). Sie geht davon aus, daß die beobachtete Wachstumsverzögerung in erster Linie von der Zahl überlebender Zellen abhängt. Bei gleichmäßiger, dosisunabhängiger Repopulierungsgeschwindigkeit der überlebenden Zellen würde die Dosiseffektkurve der Wachstumsverzögerung dann unmittelbar der Überlebenskurve in der üblichen halblogarithmischen Darstellung entsprechen:

An die Stelle der logarithmischen Überlebensrate tritt die lineare Zeitachse der Wachstumsverzögerung, die als gedachte Einheit die Verdopplungszeit der überlebenden Zellen enthält. Eine Inaktivierung auf die Überlebensrate 2^{-n} wird von n Verdopplungszeiten kompensiert, während die doppelte Verzögerungszeit bereits eine Inaktivierung von 2^{-2n} kompensiert. Umgekehrt ist auch die Abschätzung der Überlebensrate aus Wachstumsverzögerungskurven nach CY-Behandlung auf diesem Wege versucht worden (7).

Die Anwendung dieses einfachen Modells würde für das Zellüberleben nach CY eine sigmoide Dosiswirkungskurve ergeben. Der sensitive Anfangsteil und die intermediäre Abflachung könnten theoretisch mit dem Vorliegen einer gemischten Population - aus einer überwiegenden Zahl empfindlicher und einer kleinen Subpopulation relativ resistenter Zellen - erklärt werden; dies gilt jedoch nicht mehr für den steileren Endteil der Kurve. Die später folgende Beschreibung zellulärer Überlebenskurven von Tumoren aus der Literatur (Abschnitt 4.4.) gibt jedoch kaum einen Hinweis auf eine heterogene Empfindlichkeit.

Ein differenzierteres Modell, das Überlebensrate und Wachstumsverzögerung verknüpft, nimmt auf die beobachtbare Form der Wachstumskurve Bezug (1, 7). Die Kontroll-

wachstumskurve ebenso wie Rezidivwachstumskurven zeigen mit zunehmender Tumorgroße eine abnehmende Wachstumsrate und umgekehrt bei Rückextrapolation bei abnehmender Tumorgroße eine zunehmende Wachstumsrate. Unter der Voraussetzung, daß sich dies für den subklinischen Teil der Rezidivwachstumskurve fortsetzt, resultiert bei einer gleichmäßigen fraktionellen Abnahme der Überlebensrate mit zunehmender Dosis eine sublineare Zunahme der Wachstumsverzögerung. Dieses Modell könnte den Verlauf der Einzeldosiseffektkurve bis etwa 210 mg/kg CY erklären, nicht jedoch den anschließenden steilen Anstieg.

Alternativ dazu kommt auch eine kompensatorische Beschleunigung der Proliferation überlebender Zellen mit dem Erreichen einer kritischen dosisabhängigen Zelldepletion in Frage. Sie kann beispielsweise durch das Einströmen ruhender überlebender Zellen in den Zellzyklus (Recruitment) bedingt sein. Dieser Proliferationsschub stellt nur ein begrenztes Proliferationspotential dar; nach seiner Ausschöpfung nimmt die Verzögerungskurve wieder die ursprüngliche Steilheit an.

4.4. Zellinaktivierung durch CY

CY ist in vitro unwirksam und entfaltet seine Wirkung erst in vivo nach einer Giftung durch die Mikrosomen der Leber. Eine Bestimmung seiner zytoletalen Wirksamkeit ist daher an Zellkulturen nicht ohne weiteres möglich. Die Überlebensfähigkeit behandelter Zellen läßt sich jedoch auch nach Behandlung in vivo dadurch quantifizieren, daß der behandelte Tumor mechanisch und enzymatisch in Einzelzellen zerlegt und die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen in der Zellkultur untersucht wird. Neben diesem direkten Verfahren, das nur in sehr wenigen Systemen durchführbar ist, steht auch die Austestung in vivo zur Verfügung. So bietet die i.v. In-

jektion definierter Zellzahlen aus dem behandelten Tumor und die Auszählung dadurch erzeugter Lungenmetastasen im Wirtstier (11) grundsätzlich die gleiche Aussage. Noch breiter anwendbar ist die subcutane Überimpfung definierter Zellmengen nach der sog. "endpoint dilution" Methode nach HEWITT (9).

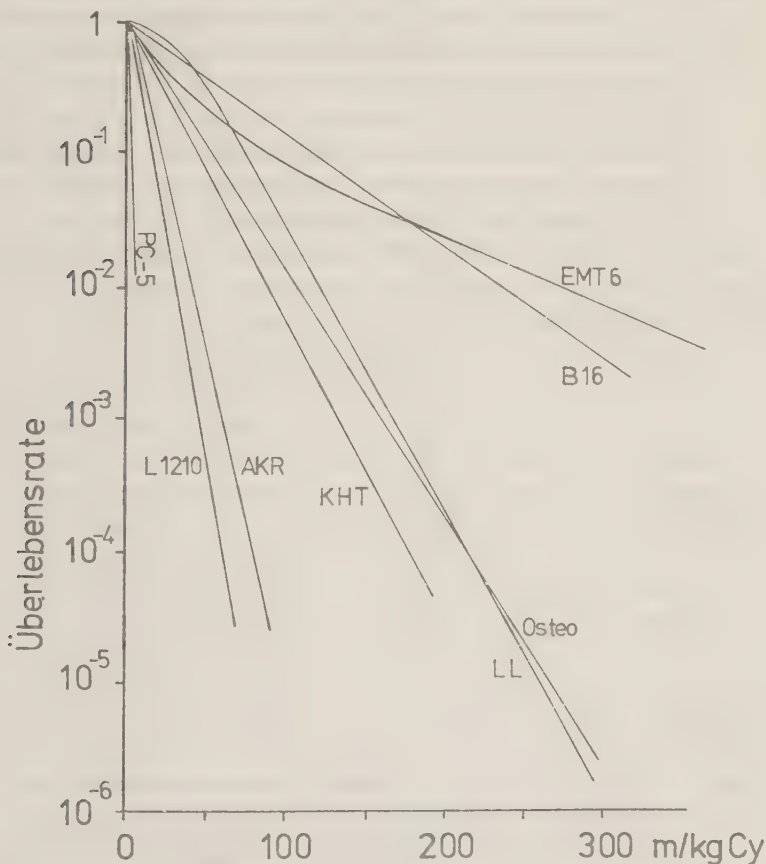


Abb. 12 : Zelluläre Überlebenskurven verschiedener Tumorsysteme nach Behandlung mit CY in vivo. Entnahme und Austestung durch verschiedene koloniebildende Verfahren in vitro oder in vivo 18-24 Std. nach Behandlung (nach STEEL (24)).

Die Überlebensrate wird hier durch den Vergleich der 50 % -take-Dosis, d.h. derjenigen Zahl morphologisch intakter Zellen, die für eine Angehrate von jeweils 50 % notwendig ist, ermittelt. Speziell nach Behandlung mit CY wurde hier in Tumorsystemen, die sich für einen simultanen Vergleich dieser Methoden eignen, eine ausgezeichnete Übereinstimmung der Überlebensraten gefunden (26). Eine Zusammenstellung aller Daten aus der Literatur zeigt die Abb. 12, die der Monographie von STEEL (24) entnommen wurde. Als Maß der zellulären Empfindlichkeit wurde aus diesen Kurven die sog. D_0 abgegriffen, d.h. diejenige Dosis, die die Überlebensrate jeweils um den Faktor e senkt (14). Eine Aufstellung dieser Werte enthält die Tabelle 4.

Tumorsystem	Versuchstier	D_0 (mg/kg CY)	Autor
PC-5		1,7	Ogawa et al. 1973 (21)
L 1210		8,3	Razek et al. 1974 (23)
AKR Lymphom	AKR-Maus	11,7	Bruce et al. 1967 (3)
KHT Sarkom	C3H-Maus	21,7	Lin und Bruce 1972 (19)
Lewis lung-carcinom	C57BL-Maus	23,3	Steel und Adams (25) 1975
Osteosarkom	C57BL/CBA F_1 -Maus	25,0	van Putten und Lelieveld (33) 1970
B16-Melanom	C57BL-Maus	41,3	Hill und Stanley (12) 1975
* LMC ₁ Mamma-carcinom	Wistar-Ratte	58,0	Moore und Dixon (20) 1978
EMT 6	Balb/c-Maus	88,3	Hahn et al. 1973 (8)

Tab. 4 : Zelluläre CY-Empfindlichkeit verschiedener Tumorsysteme nach Behandlung mit Einzeldosen in vivo. Die D_0 -Werte sind größtenteils aus den veröffentlichten zellulären Überlebenskurven abgegriffen. * nicht in Abb. 12 enthalten.

Übereinstimmend wurde in allen Versuchen der Tumor 18 bis 24 Stunden nach Behandlung entnommen, um - wie in situ - den Zellen die Reparatur des sog. potentiell letalen Schadens zu ermöglichen. Sieht man von den 3 leukämischen Tumoren ab, so liegt für 3 der 5 soliden Tumoren der Maus die D_0 bei rund 25 mg/kg CY. Für das hier untersuchte Fibrosarkom wurde in Vorversuchen mit der "endpoint dilution" - Methode ebenfalls eine D_0 von 30 mg/kg CY ermittelt (KUMMERMEHR, unveröffentlicht).

Das wesentliche Charakteristikum dieser Dosiseffekt-kurven ist der in fast allen Fällen exponentielle Verlauf. Lediglich das Lewis-Lungen-Carcinom (25) weist eine kleine initiale Schulter auf; beim EMT 6-Sarkom (8) wurde ein biphasischer Verlauf mit einer steileren initialen Komponente beschrieben, der möglicherweise auf zwei Populationen klonogener Zellen mit unterschiedlicher Empfindlichkeit oder Erholungsfähigkeit vom potentiell letalen Schaden beruht; in einer anderen Sublinie dieses Tumors ist die Überlebenskurve jedoch monophasisch (30,31). Unter der Annahme, daß mit der Zerlegung des Tumors in Einzelzellen keine Selektion zugunsten bestimmter Subpopulationen erfolgt, muß der exponentielle Kurvenverlauf dahingehend gedeutet werden, daß die zelluläre Empfindlichkeit in einem gegebenen Tumor weitgehend einheitlich ist und die Inaktivierung analog der Strahlenwirkung stochastisch erfolgt (14). Der strikt exponentielle Verlauf bedeutet, daß CY im Gegensatz zu Zytostatika anderer Klassen (vor allem Antimetaboliten) nicht zyklusphasenspezifisch ist. Des weiteren ist die Wirksamkeit auch gegen hypoxische (12,25,36) und gegen ruhende Zellen im Tumor offenbar nicht geringer.

Wegen der Zunahme ruhender Zellen bei steigender Tumorgroße wurden in diesem Zusammenhang auch große intramuskuläre EMT 6 - Tumoren mit kleinen pulmonalen Meta-

stasen auf ihre CY-Empfindlichkeit verglichen; die zellulären Überlebenskurven waren identisch (31). Eine weitere Schlußfolgerung, die sich aus einem exponentiellen Verlauf über drei und mehr Dekaden ergibt, betrifft die Verteilung und Verfügbarkeit des Zytostatikums bzw. seiner aktiven Wirkformen. Sie spricht eindeutig für die Annahme, daß eine ausreichend homogene Konzentration in allen klonogenen Zellen des Tumors erreicht wird.

4.5. Fraktionierungsexperimente (2×140 mg/kg) mit kurzem Fraktionierungsintervall (0 - 24 h)

Die Fraktionierungstherapie dient im wesentlichen der Verbesserung der Selektivität, also der therapeutischen Breite. Sinnvoll ist jedoch auch eine isolierte Betrachtung der Tumorstoffwirkung. Ohne tiefergehende Kenntnis der Mechanismen könnte die Effektivität einer Fraktionierung an der Einzeldosiswirkungskurve ansetzen. Die Wirkung einer hohen Einzeldosis, beispielsweise 280 mg/kg, ist wesentlich geringer als die Summe der Wirkungen, die sich aus 2 entsprechenden Halbdosen von 140 mg/kg ergibt. Dies bedeutet eine Sensibilitätsabnahme des Tumors bzw. des Tumorstoffsystems. Es ist denkbar, daß bei einer Aufteilung der Einzeldosis von 280 mg/kg in 2 gleichgroße Fraktionen in Abhängigkeit vom Fraktionierungsintervall Vorgänge ablaufen, die den nach der Erstdosis zurückbleibenden Resttumor günstigenfalls wieder die ursprüngliche Empfindlichkeit erreichen lassen. Ausdruck dafür ist die meßbare Wachstumsverzögerung in Abhängigkeit vom Fraktionierungsintervall.

Speziell für die Behandlung mit fraktionierter Bestrahlung sind mehrere Vorgänge bekannt, die von entscheidender Bedeutung für Empfindlichkeitsänderungen bereits bei relativ kurzen Fraktionierungsintervallen sind (13). Sie ergeben sich einerseits aus der zellulären Überle-

benskurve^f gegenüber Strahlen, andererseits aus der geweblichen Organisation des Tumorzellverbandes. Von entscheidender Bedeutung für eine fraktionierte Bestrahlung ist die Eigenschaft von Zellen, daß sie einen Teil der Strahlenwirkung als sog. subletalen Schaden akkumulieren und bis zu einer darauffolgenden Fraktion reparieren können. Exponentielle Überlebenskurven von Zellen auf Bestrahlung weisen deshalb eine mehr oder weniger ausgeprägte Schulter im Anfangsteil auf; diese Schulter wiederholt sich voll bei einer darauffolgenden Bestrahlung, wenn das Bestrahlungsintervall nicht kürzer als 6 Stunden ist. Dieser als ELKIND - Effekt beschriebene Vorgang der intrazellulären Erholung drückt sich auch in der Wachstumsverzögerung von Tumoren aus, d.h. gleiche Gesamtdosen sind bei einer Aufteilung auf mehrere Fraktionen zunehmend weniger wirksam, bzw. der Effekt einer Einzeldosis läßt sich nur durch eine Erhöhung der Gesamtdosis wieder herstellen (4).

Dieser Fraktionierungseffekt ist für CY nicht zu erwarten. Die Mehrzahl aller zellulären Überlebenskurven (Abb. 12) zeigt einen strikt exponentiellen Verlauf ohne Schulter (vor allem auch die des SSK 31). Auch die steile Anfangsneigung der Dosiseffektkurve der Wachstumsverzögerung spricht gegen die Fähigkeit der Tumorzellen, kleine CY-Dosen zu kompensieren.

Von wesentlicher Bedeutung für die Empfindlichkeit bei fraktionierter Strahlenbehandlung ist eine Reoxygenierung im Bestrahlungsintervall, d.h. eine Verbesserung der Sauerstoffversorgung von Tumorzellen, die ursprünglich hypoxisch sind und daher eine Bestrahlung bevorzugt überleben. Dieser Vorgang beginnt meist unmittelbar nach der Erstdosis und verläuft mit tumortypischen Fluktuationen (15). Beim Fibrosarkom SSK 31 erreicht die Reoxygenierung ein Maximum am 2. Tag, gefolgt von einem Wiederanstieg der hypoxischen Fraktion bis zum

4. Tag über den Ausgangswert hinaus (18). Im Gegensatz zu locker ionisierenden Strahlen hängt jedoch nach praktisch allen bisherigen Befunden die CY-Wirkung nicht von der Sauerstoffversorgung ab. Wie in Abb. 12 gezeigt, reagieren Tumorzellpopulationen auf CY mit einheitlicher Empfindlichkeit bis zu Überlebensraten von 10^{-3} und darunter, während die strahlenbiologisch relevanten hypoxischen Fraktionen meist in der Größenordnung 1 - 30 % liegen (15). Die Unabhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration geht auch daraus hervor, daß nach einer Erstbehandlung mit CY die überlebende Zellpopulation bei nachfolgender Bestrahlung eine erniedrigte Ausgangszellzahl, aber - mit einer Ausnahme (5) - wieder die gleiche relative Zusammensetzung an euoxischen und hypoxischen Zellen aufweist (12,36). Aus der Indifferenz der CY-Wirkung gegenüber der Anwesenheit von Sauerstoff folgt einmal, daß die komplexe Gestalt der Dosiseffektkurve nach Einzelbehandlung nicht durch eine Mischpopulation mit einem effektiven Anteil hypoxischer Zellen bedingt sein kann. Für die fraktionierte Behandlung scheiden ebenfalls Empfindlichkeitsschwankungen aufgrund dynamischer Veränderungen der Sauerstoffversorgung aus.

Bezüglich der Strahlenwirkung spielt ferner die Umverteilung überlebender Zellen im Zellzyklus bis zum Zeitpunkt der zweiten Bestrahlung, die sog. Redistribution, eine Rolle. Die einzelnen Zyklusphasen sind unterschiedlich strahlenempfindlich; die Redistribution kann daher zu erhöhter oder erniedrigter Empfindlichkeit für die Restpopulation führen. Entsprechende Empfindlichkeitsschwankungen aufgrund dieses Effektes lassen sich allerdings eher in der Zellkultur und kaum im soliden Tumor in situ nachweisen. Da CY ein Zytostatikum mit weitgehend fehlender Phasenspezifität ist, kann auch dieser zellkinetische Effekt außer acht gelassen werden. Dies gilt wahrscheinlich auch für die eventuell

vorhandene Rekrutierung ruhender Zellen in den Zellzyklus. Der Befund, daß ruhende Knochenmarksstammzellen gegen CY wesentlich resistenter sind als proliferierende (33) stellt wahrscheinlich eine zellspezifische Ausnahme dar und kann nicht ohne weiteres auf Tumorstammzellen übertragen werden (32). Untersuchungen am RIB 5 - Fibrosarkom der Ratte ergaben zellkinetische und morphologische Hinweise auf eine Einschleusung ruhender Zellen bereits 1 d nach Gabe von 100 mg/kg CY; bei einer Fraktionierung der Dosis in 2 x 50 mg/kg mit 1, 2, 3 und 7 d Abstand war jedoch die Wachstumsverzögerung nach allen Intervallen gleich (22).

Im Unterschied zur Bestrahlung ist darüberhinaus speziell bei einem aktivierungsbedürftigen Zytostatikum zu berücksichtigen, daß mit der exogen zugeführten Dosis die lokale Wirkmenge nicht definiert ist. Insbesondere bei fraktionierter Gabe können Änderungen in der Aktivierungsfähigkeit durch den Wirt eintreten. Darüberhinaus ist nicht klar, in welcher Form die Verlaufskurve der Serumkonzentration und Expositionszeit die Quantität 'Dosis' bestimmt. Die beobachtbaren Änderungen der Wachstumsverzögerung bei Variation des Fraktionierungsintervalls zwischen 1 und 24 Stunden zeigen Veränderungen, die nicht interpretiert werden können. Eine nicht signifikante Zunahme der Wirksamkeit wird bei einem Behandlungsintervall von 1 Stunde beobachtet. Die Möglichkeit, daß hierbei der ausgeglichene Serumspiegel (Halbwertszeit wahrscheinlich unter 20 Minuten) eine Rolle spielt, wird durch die insgesamt erniedrigte Wirkung bei einer Protrahierung der Gesamtdosis (4 x 70 mg/kg im stündlichen Abstand) eher unwahrscheinlich. Als signifikant gegenüber der Einzeitgabe ist lediglich die Wirkungsverminderung beim 6 h-Intervall anzusprechen. Aufgrund zellulärer Empfindungsänderungen kann sie kaum erklärt werden. Möglicherweise steht sie mit dem in der Literatur mitgeteilten Befund im Zusammenhang, daß 4 Stunden nach einer Erstinjektion die

Aktivierung einer Zweitdosis von CY in der Leber bis zu 20 % vermindert sein kann (10). Insgesamt ist festzustellen, daß auf der Basis der beobachtbaren Tumorkwirkung allein die Kurzzeitfraktionierung keine therapeutische Verbesserung verspricht, weil sie sich von einer Einzelgabe nicht wesentlich unterscheidet.

4.6. Fraktionierungsexperimente (2 x 140 mg/kg) mit langem Fraktionierungsintervall (0 - 7 Tage)

Im Gegensatz zu den Kurzzeitintervallen wird mit Fraktionierungsabständen zwischen 1 und 7 Tagen eine stetige Zunahme der Wirksamkeit beobachtet. Die Wachstumsverzögerung insgesamt nimmt von 11,4 auf 15,9 Tage zu. Sie erreicht damit schrittweise wieder eine Wachstumsverzögerung, die der Summe der Einzelwirkungen von 2 Einzeldosen von 140 mg/kg (16,2 Tage) entspricht. als wesentlicher Vorgang, der die Empfindlichkeit eines Tumors in diesem Zeitraum verändern kann, ist die Repopulierung zu nennen. Daß überlebende Zellen mit einer beachtlichen Teilungsrate nachgebildet werden müssen, belegen bereits die Wachstumskurven nach Einzeldosen. Bei einer vorsichtigen Rückextrapolation der Volumenkurve nach 140 mg/kg zeigt sich, daß die Ausgangsgrösse etwa nach 7 Tagen wieder erreicht wird. Dies kann allerdings nur als indirekter Hinweis darauf gewertet werden, daß auch eine vergleichbare Zahl klonogener Zellen wieder erreicht wird, wie sie im unbehandelten Tumor zur Zeit der CY-Gabe bestand. Geht man davon aus, daß innerhalb von 7 Tagen eine volle Restitution eintritt, so müssen alle Zweitdosen, die vor dem 7. Tag verabreicht werden, auf einen in seiner Zellzahl reduzierten Tumor treffen. Bei einer angenommenen Überlebensrate im SSK 31 nach 140 mg/kg CY von etwa 10^{-2} ergibt sich im Mittel für die Repopulierung eine mittlere Verdopplungszeit von $7/5,5 \text{ d} = 1,1 \text{ d}$. Dies entspricht einer effektiven Verdopplungszeit in der Grös-

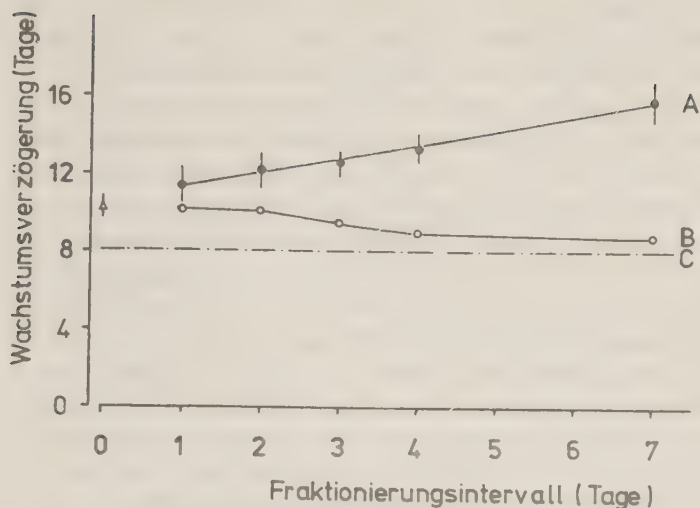


Abb. 13 : Wachstumsverzögerung nach 2 x 140 mg/kg CY in Abhängigkeit vom Fraktionierungsintervall. A: Wachstumsverzögerung von der Erstdosis an. B: Netto-Wachstumsverzögerung vom Zeitpunkt der Zweitdosis an. C: Wachstumsverzögerung einer Einzeldosis von 140 mg/kg. Δ: CY-Einzeldosis 280 mg/kg.

senordnung der potentiellen Verdopplungszeit des unbehandelten Tumors (17). Am B-16 Melanom bestimmten STEPHENS et al. (27) nach 300 mg/kg CY für die Phase der schnellen Repopulierung eine T_d von 1,5 d.

Die absolute Empfindlichkeit des Tumors, gemessen als Wachstumsverzögerung vom Zeitpunkt der zweiten Dosis an, müßte demnach unmittelbar nach der Erstdosis am größten sein und mit steigendem Behandlungsintervall abnehmen. Eine entsprechende Auftragung zeigt die Abb. 13. Zieht man von der nach Erstdosis gemessenen Wachstumsverzögerung (Kurve A) das Behandlungsintervall ab, erhält man als Maß der Empfindlichkeit des Tumors zum Zeitpunkt der Zweitdosis die schräg nach unten verlaufende Kurve der Netto-Wachstumsverzögerung (Kurve B), die bei 7 Tagen etwa die Empfindlichkeit des unbehan-

delten Tumors erreicht. Die darin dargestellte Wirkungsabnahme beträgt jedoch nur insgesamt 1,6 Tage, was zunächst im Widerspruch zu einer effektiven Repopulierung zu stehen scheint. Eine Erklärung bietet sich jedoch in Analogie zum Verhalten nach Einzeldosen an. Für die dort beobachtete Verlangsamung der Wirkungszunahme im mittleren Dosisbereich wurde eine kompensatorische Beschleunigung der Proliferation vermutet. Der gleiche Vorgang kann auch bei fraktionierter Behandlung dahingehend wirksam werden, daß die effektive Repopulierungsgeschwindigkeit nach der 2. Dosis, also posttherapeutisch, vom Ausmaß der jeweils erreichten Zelldepletion abhängt. Da mit zunehmendem Behandlungsintervall infolge der Repopulierung die absolute Zelldepletion nach der 2. Dosis immer geringer wird, kann damit der Reiz zu einer beschleunigten posttherapeutischen Proliferation abnehmen. Die Kurve der Nettowachstumsverzögerung, als Maß der "Tumorsensibilität" zum Zeitpunkt der Zweitdosis, stellt demnach eine Resultante aus der abgelaufenen Repopulierung und der Aktivierung des Proliferationspotentials nach der Behandlung dar. Bemerkenswert ist ein Vergleich dieser Daten mit dem Verhalten von Tumoren bei fraktionierter Bestrahlung. Durch Abklemmen des Tumors während der Bestrahlung läßt sich auch hier eine einheitlich empfindliche (= 100 % hypoxische) Population herstellen und durch Variieren des Bestrahlungsintervalls die Repopulierung dieser vor und nach der Bestrahlung euoxischen Tumorzellen relativ gezielt darstellen. In den untersuchten Fällen zeigt sich durchweg eine Abnahme der Gesamtwachstumsverzögerung, d.h. ein Wirkungsverlust mit steigendem Intervall (16). Da die Dosiseffektkurve der Wachstumsverzögerung nach Einzeitbestrahlung mit stetig zunehmender Steilheit verläuft (im Gegensatz zum konvexen Kurventeil der CY-Kurve), entspricht dieser Wirkungsverlust ebenso wie die Wirkungszunahme bei CY formal den Gegebenheiten der Ein-

zel-Effekt-Kurve. Die Analyse der Wachstumsverzögerung nach Einzeldosen kann demnach möglicherweise bereits Aufschlüsse über die Wirksamkeit der fraktionierten Behandlung geben, wenn der erreichte Effekt im wesentlichen von der Wirkung auf die Proliferationsgeschwindigkeit abhängt. Dies scheint nicht für die kurative Zielsetzung, bei der die Eradikation der letzten Tumorzellen angestrebt wird, aber für eine palliative Behandlung klinisch wichtig.

4.7. Vergleich zu den Versuchsergebnissen am Adenocarcinom der Maus

Zeitlich parallel wurden die hier beschriebenen Experimente von FEIL (6) am Adenocarcinom 284 mit den gleichen Methoden durchgeführt. Im Vergleich zeigten sich

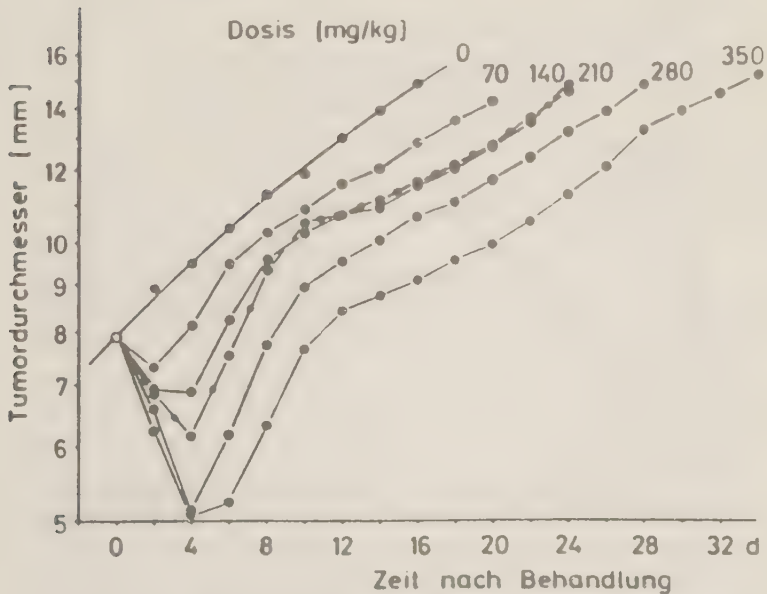


Abb. 14 : Wachstumsverlauf des Adenocarcinoms 284 nach CY-Einzeldosen.

charakteristische Unterschiede im Verhalten des Tumorstwachstums nach Behandlung mit CY-Einzeldosen (Abb. 14). Während das Fibrosarkom SSK 31 bis zu einer Dosis von 280 mg/kg CY nur mit einem verzögerten Wachstumsstopp reagierte und sich erst bei 350 mg/kg CY eine Durchmesserverkleinerung von ca. 7,5 auf 6,5 mm abzeichnete, reagiert das Adenocarcinom 284 sofort mit einem Wachstumsstopp und einer Abnahme der Ausgangsgröße bis zum 5. Tag nach Behandlung, um dann deutlich schneller als die Kontrolle bis etwa zur Behandlungsgröße wieder heranzuwachsen. Anschließend verlangsamte sich das Wachstum in Abhängigkeit von der Dosis und blieb etwas hinter der Kontrolle zurück. Die erzielten Wachstumsver-

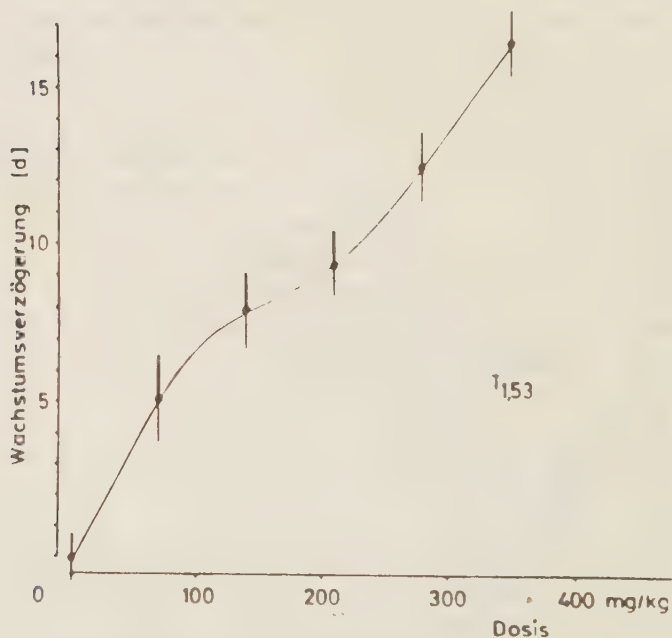


Abb. 15 : Wachstumsverzögerung des Adenocarcinoms 284 nach Behandlung mit CY-Einzeldosen.

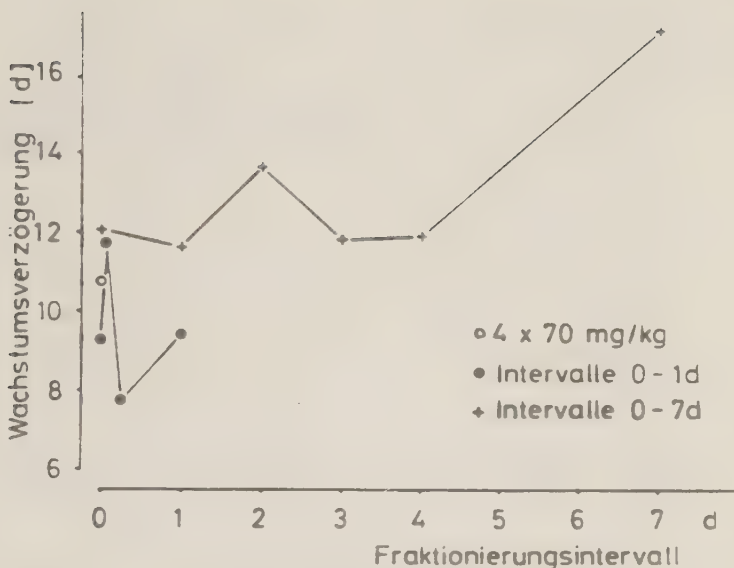


Abb. 16 : Wachstumsverzögerung des Adenocarcinoms 284 nach 2 x 140 mg/kg CY in Abhängigkeit vom Fraktionierungsintervall.

zögerungen waren bei beiden Tumoren etwa gleich; es zeigte sich ebenfalls eine s-förmige Dosis-Wirkungs-Kurve (Abb. 15), wobei der Wendepunkt jedoch deutlich unter 280 mg/kg lag.

Die Wirkung auf eine fraktionierte Behandlung des Adenocarcinoms 284 ist in Abb. 16 dargestellt. Für die Kurzzeitintervalle (0-24 h) mit zwei Einzeldosen einschließlich der 4fachen Fraktionierung verlaufen die Kurven für beide Tumoren parallel. Für die Langzeitintervalle (0-7 d) zeigte sich für das Adenocarcinom 284 bei ebenfalls fast linearem Anstieg der Wachstumsverzögerung bis zum 7. Tag ein relatives Maximum bei 2 Tagen. Für beide Tumoren gleicht die Wirkung der fraktionierten Dosen bei kurzen Intervallen etwa dem Effekt der Einzeldosis von 280 mg/kg, wogegen bei den langen Intervallen die Teildosen jeweils mit dem vollen Effekt der Einzeldosis von 140 mg/kg eingehen (Addition der Effekte).

5. Zusammenfassung

An einem transplantablen Fibrosarkom wurde die Wirkung von einmaliger und fraktionierter Gabe von CY mit Hilfe der therapieinduzierten Wachstumsverzögerung untersucht. Nach allen Behandlungsschemata erreicht der Tumor nach dosisabhängiger Latenzzeit wieder eine der Kontrolle vergleichbare Wachstumsgeschwindigkeit. Die Dosiswirkungsbeziehung dieser Latenzzeit (Wachstumsverzögerung) folgt nach Einzeldosen zwischen 70 - 350 mg/kg CY einer sigmoiden Kurve mit steilem Anfangs- und Endteil und einer geringeren Wirksamkeit im intermediären Dosisbereich um 200 mg/kg CY. Als Erklärung bietet sich eine kompensatorische Proliferationssteigerung an, die durch den Einstrom ruhender Zellen bedingt ist und bei höheren Dosen ausgeschöpft ist. Durch eine Kurzzeitfraktionierung von 2 x 140 mg/kg CY im Abstand von 1 und 24 Stunden konnte keine wesentliche Änderung des Therapie-Effektes erzielt werden. Beim 6 Stunden-Fraktionierungsintervall war der Effekt signifikant kleiner, was am ehesten pharmakokinetisch durch eine geringere Aktivierung der Zweitdosis zu diesem Zeitpunkt erklärt werden kann. Eine protrahierte Gabe von 4 x 70 mg/kg CY im stündlichen Abstand war ebenfalls etwas weniger wirksam als die Einzeldosis von 280 mg/kg CY. Bei einer Ausdehnung des Fraktionierungsintervalls zwischen 1 - 7 Tage zeigt sich eine etwa lineare Zunahme der Gesamtwachstumsverzögerung, die schließlich wieder die Summe der Wirkung von zwei Einzeldosen zu 140 mg/kg CY erreicht. Als Erklärung wird angenommen, daß mit der Erstdosis eine rasche Repopulierung ausgelöst wird, die mit der Zweitdosis erreichte Zelldepletion dadurch stetig geringer wird und auf diesem Weg die posttherapeutische Proliferation weniger stimuliert wird. Für die

klinische Behandlung mit kurativer Zielsetzung verspricht die Langzeitfraktionierung keine Verbesserung, bei Übertragbarkeit der experimentellen Ergebnisse kann sie jedoch bei palliativer Behandlung einen Therapiegewinn darstellen.

6. Literatur

1. BEGG, A.C.:

Analysis of growth delay data: potential pitfalls.
Brit. J. Cancer 41, suppl. IV, 93-97 (1980).

2. BROCK et al.:

Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in vivo
und in vitro.
Cancer 27, 1512-1529 (1971).

3. BRUCE, W.R., VALERIOTE, F.A., MEEKER, B.E.:

Survival of mice bearing a transplantable syngenetic
lymphoma following treatment with cyclophosphamide,
5-fluoro-uracil or BCNU.
J. Natl. Cancer Inst. 39, 257-266 (1967).

4. DENEKAMP, J., STEWART, F.A.:

Evidence for repair capacity in mouse tumours rela-
tive to skin.
Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 5, 2003-2010
(1979).

5. DIXON, B., MOORE, J.V., SPEAKMAN, H.:

Radiobiological hypoxia of a transplanted rat tumour
and the effect of treatment with cyclophosphamide.
Europ. J. Cancer 14, 1383-1387 (1978).

6. FEIL, A.:

Die Wirkung von Cyclophosphamid auf das Adenocarcinom
284 der Maus.
Dissertation, Universität München (1980).

7. GRISWOLD, D.P.:

The potential for murine tumor models in surgical
adjuvant chemotherapy.
Cancer Chemotherapy Reports (part 2) 5, 187-204 (1975).

8. HAHN, G.M., RAY, G.M., GORDON, L.F., KALIMAN, R.F.:
Response of solid tumor cells exposed to chemotherapeutic agents in vivo: cell survival after 2- and 24-hour exposure.
J. Natl. Cancer Inst. 50, 529-533 (1973).
9. HEWITT, H.B.:
Studies of the quantitative transplantation of mouse sarcoma.
Brit. J. Cancer 7, 367-383 (1953).
10. HILL, D.L.:
A review of cyclophosphamide.
Charles C. Thomas-Publisher, Springfield-Illinois-USA.
11. HILL, R.P., BUSH, R.S.:
A lung colony assay to determine the radiosensitivity of the cells of a solid tumor.
Int. J. Radiation Biol. 15, 435-444 (1969).
12. HILL, R.P., STANLEY, J.A.:
The response of hypoxic B-16 melanoma cells to in vivo treatment.
Cancer Res. 35, 1147-1153 (1975).
13. HUG, O.:
Einführung in das Problem des Zeitfaktors und seine therapeutische Bedeutung.
Strahlentherapie 153, 362-370 (1977).
14. HUG, O., KELLERER, A.:
Stochastik der Strahlenwirkung.
Berlin, Springer (1966).
15. KALIMAN, R.F.:
The phenomenon of reoxygenation and its implications for fractionated radiotherapy.
Radiology 105, 135-142 (1972).

16. KUMMERMEHR, J., TROTT, K.R.:

Rate of repopulation in a slow and a fast growing mouse tumour.
Proc. Second Internatl. Meeting on Progress in Radio-Oncology, Baden/Wien, 1981 (in Druck).

17. KUMMERMEHR, J., TROTT, K.R.:

Sensitization of a transplantable murine fibrosarcoma by partial synchronisation with Hydroxyurea.
In: Radiobiological Research and Radiotherapy, Vol. 1, 427-442. International Atomic Energy Agency, Wien (1976).

18. KUMMERMEHR, J., FINK, R., PREUSS-BAYER, G., TROTT, K.R.:

Reoxygenierung in einem transplantablen Fibrosarkom der Maus.
Strahlentherapie 157, 272-276 (1981).

19. LIN, H., BRUCE, W.R.:

Chemotherapy of the transplanted KHT fibrosarcoma in mice.
Ser. Haemat., Vol. V, 89-104 (1972).

20. MOORE, J.V., DIXON, B.:

The gross and cellular response of a rat mammary tumour to single doses of cyclophosphamide.
Europ. J. Cancer 14, 91-99 (1978).

21. OGAWA, M., BERGSAGEL, D.E., McCULLOCH, E.A.:

Chemotherapy of mouse myeloma: quantitative cell culture predictive of response in vivo.
Blood 41, 7-15 (1973).

22. PEEL, S., COWEN, D.M.:

The effect of cyclophosphamide on the growth and cellular kinetics of a transplantable rat fibrosarcoma.
Brit. J. Cancer 26, 304-314 (1972).

23. RAZEK, A., VIETTI, T., VALERIOTE, F.:

Optimum time sequence for administration of vincristine and cyclophosphamide in vivo.
Cancer Res. 34, 1857-1861 (1974).

24. STEEL, G.G.:

Growth kinetics of tumours. Cell population kinetics in relation to the growth and treatment of cancer.
Clarendon Press, Oxford (1977).

25. STEEL, G.G., ADAMS, K.:

Stem cell survival and tumor control in the Lewis lung carcinoma.
Cancer Research 35, 1530-1535 (1975).

26. STEEL, G.G., ADAMS, K., STEPHENS, T.C.:

Clonogenic assays in the B-16 melanoma: response to cyclophosphamide.
Brit. J. Cancer 36, 618-624 (1977).

27. STEPHENS, T.C., PEACOCK, J.H.:

Tumour volume response, initial cell kill and cellular repopulation in B-16 melanoma treated with cyclophosphamide and 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea.
Brit. J. Cancer 36, 313-321 (1977).

28. THOMLINSON, R.H., CRADDOCK, E.A.:

The gross response of an experimental tumour to single doses of X-rays.
Brit. J. Cancer 21, 108-123 (1967).

29. TROTT, K.R., SZCZEPANSKI, L.v., KUMMERMEHR, J., HUG, O.:

Tumour control probability and tumour regression rate after fractionated radiotherapy of two mouse tumours.
In: Radiobiological Research and Radiotherapy, Vol. 1, 29-42. International Atomic Energy Agency, Wien (1976).

30. TWENTYMAN, P.R.:

Sensitivity to cytotoxic agents of the EMT 6 tumour in vivo: tumour volume versus in vitro plating.

1. cyclophosphamide.

Brit. J. Cancer 35, 208-217 (1977).

31. TWENTYMAN, P.R., BLEEHEN, N.M.:

The sensitivity to cytotoxic agents of the EMT 6 tumour in vivo. Comparative response of lung nodules in rapid exponential growth and of the solid flank tumour.

Brit. J. Cancer 33, 320-328 (1976).

32. VALERIOTE, F., VAN PUTTEN, L.:

Proliferation-dependent cytotoxicity of anticancer agents: a review.

Cancer Res. 35, 2619-2630 (1975).

33. VAN PUTTEN, L., LELIEVELD, P.:

Factors determining cell killing by chemotherapeutic agents in vivo. 1. cyclophosphamide.

Europ. J. Cancer 6, 313-321 (1970).

34. VOELCKER, G.:

Persönliche Mitteilung

35. VOELCKER et al.:

Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in vivo und in vitro.

Arzneimittelforsch. 24, 1172-1176 (1974).

36. WHARAM, M.D., PHILLIPS, T.L., KANE, L., UTLEY, J.F.:

Response of a solid tumor to in vivo combined chemotherapy and irradiation.

Radiology 109, 451-455 (1973).

LEBENS LAUF

Ich wurde am 18. August 1950 als Sohn der Eheleute Josef und Maria Wiedmann in Dachau geboren.

Am gleichen Ort besuchte ich die Volksschule und absolvierte eine Lehre bei der Deutschen Bundespost.

1969 erlangte ich über die Berufsaufbauschule Dachau die Fachschulreife und anschließend 1972 über den 2. Bildungsweg im Bayernkolleg Augsburg die Hochschulreife.

Nach Ableistung des Grundwehrdienstes begann ich 1974 an der Ludwig Maximilians-Universität in München mit dem Studium der Medizin. Die Ärztliche Vorprüfung legte ich im Jahre 1975, das Staatsexamen im Jahre 1979 ab.

Seit Januar 1980 arbeite ich als Assistenzarzt auf der Internen Abteilung des Kreiskrankenhauses Mallersdorf.

